

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450131

研究課題名(和文) CDKファミリーPCK3の活性調節機構および生理機能の解明

研究課題名(英文) Regulatory mechanism and physiological role of the CDK family member PCK3

研究代表者

湯浅 恵造 (YUASA, KEIZO)

徳島大学・ソシオテクノサイエンス研究部・准教授

研究者番号：70363132

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：PCK3の活性調節機構および生理機能の解明を目的として、以下の成果を得た。PCK3はcyclin Aとの結合とPKAによる12番目Serのリン酸化の双方によって活性化された。PCK3ノックダウンHEK293T細胞では、細胞膜辺縁にF-actinの凝集が観察され、また、アクチン脱重合因子であるコフィリンのリン酸化が増加した。PCK3ノックダウン細胞において細胞遊走が促進された。細胞接着斑の構成因子であるFAK1は細胞接着によって活性化されたが、恒常活性型PCK3の過剰発現によってその活性化は抑制された。

研究成果の概要(英文)：1) The activity of PCK3 was increased via interaction with cyclin A and phosphorylation at Ser12 by PKA. 2) PCK3 knockdown HEK293T cells exhibited an increase in cell size and F-actin accumulation at the edges of cell membranes and increased cofilin phosphorylation at Ser3, suggesting that PCK3 is involved in the regulation of actin reorganization. 3) PCK3-knockdown HEK293T cells exhibited an increase in cell motility. 4) The activity of focal adhesion kinase 1 (FAK1), which is activated during early cell adhesion, was suppressed by PCK3, suggesting that PCK3 might act as a negative regulator of FAK1.

研究分野：農学

キーワード：情報伝達

1. 研究開始当初の背景

サイクリン依存性キナーゼ (cyclin dependent kinase : CDK) は細胞周期制御において中心的な役割を担う Ser/Thr プロテインキナーゼである。CDK は、それぞれ特異的なサイクリンとの結合により活性化することが知られており、その活性調節機構やシグナル伝達機構に関して多くの研究が進められている。CDK の触媒ドメインには特徴的なモチーフである PSTAIRE 配列が保存されており、この配列がサイクリンとの結合に重要であると考えられている。CDK ファミリーに属する PCTAIRE kinase 3 (PCTK3/CDK18) は、PCTK1/CDK16 や PCTK2/CDK17 とともに PCTK サブファミリーを形成し、このサブファミリーは PSTAIRE 配列の代わりに、Ser が Cys に置換した PCTAIRE 配列を有している。PCTK サブファミリーは、それぞれ N 末端ドメイン、触媒ドメイン、C 末端ドメインの 3 つのドメインで構成され、触媒ドメインは PCTK のアイソフォーム間で高度に保存されており、80%以上の相同性を示すが、N 末端ドメイン、C 末端ドメインの相同性は低く、それぞれのアイソフォームの特徴を持たせていると考えられている。

多くの CDK ファミリーは組織普遍的な発現を示すのに対して、PCTK サブファミリーは組織選択的な発現を示すことから、細胞周期制御以外の生理機能を発揮することが推測されている。このサブファミリーの中で最も研究が進められている PCTK1 は、神経軸索の伸長制御や N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein のリン酸化を介して細胞内膜輸送に関与することが報告されている。さらに、最近、PCTK1 は膜結合型サイクリンである cyclin Y によって活性化され、精子形成に関与することが報告された。また、PCTK2 は Trap (tudor repeat associator with PCTAIRE 2) や CDK5 のアダプター因子である ik3-1/cables と結合し、神経軸索の伸長に関与することが示唆されている。しかしながら、PCTK3 の活性化因子は未だ同定されておらず、その活性調節機構や生理機能の解析は十分には進められていない。

2. 研究の目的

(1) PCTK3 の活性調節機構の解明

これまでに、数種の抗 cyclin 抗体を用いた *in vivo* 結合実験より、PCTK3 は cyclin A と結合すること、また、cyclin A との結合によって PCTK3 は CDK の基質の 1 つであるガン抑制遺伝子産物 retinoblastoma (Rb) タンパク質を弱いながらもリン酸化することを明らかにしている。しかしながら、弱い活性しか得られていないため、cyclin A 以外の新たな活性化因子の探索を行う。また、CDK 活性はサイクリンとの結合だけでなく、CDK-activating kinase

などのプロテインキナーゼによるリン酸化によっても調節されているため、リン酸化による活性制御についても検討する。

(2) PCTK3 の基質タンパク質の同定および生理機能の解明

PCTK3 の機能を解明する上で基質タンパク質の同定は必要不可欠である。活性化機構の解明で得られた知見を基に、まずは、簡便なプロテインアレイを用いて、PCTK3 の基質タンパク質の探索を行う。

また、RNAi 法によって PCTK3 および得られた基質タンパク質のノックダウンを行った後、各種抗リン酸化抗体を用いて、それぞれのノックダウンによる影響を調べる。

3. 研究の方法

(1) PCTK3 の活性調節機構の解明

HEK293T 細胞に Strep タグを付加した PCTK3 を発現させ、Strep-プルダウンアッセイを行った。共沈タンパク質を SDS-PAGE で分離し、銀染色によりタンパク質を検出した。空ベクターを遺伝子導入したコントロール細胞と比較して、PCTK3 に依存して検出されたタンパク質バンドについて MALDI-TOF MS による質量分析を行った。

Strep タグ PCTK3 を FLAG-cyclin K、Y、F、O とともに HEK293T 細胞に遺伝子導入した後、Strep プルダウンアッセイを行った。また、PCTK3 結合タンパク質として同定した 14-3-3 タンパク質との結合による PCTK3 活性に及ぼす影響を、Rb タンパク質を基質とした *in vitro* キナーゼアッセイにより解析した。

リン酸化モチーフ検索により、PCTK3 の推定リン酸化部位を探索した。プロテインキナーゼによるリン酸化を特異的に認識する抗リン酸化モチーフ抗体を用いたイムノプロット解析により、PCTK3 が刺激に応答して細胞内でリン酸化されるか解析した。また、推定リン酸化部位の Ser/Thr を Ala に置換した非リン酸化変異体を作製し、*in vitro* キナーゼアッセイにより、PCTK3 のリン酸化部位を同定した。さらに、同定されたリン酸化部位 Ser/Thr を Asp に置換した擬似リン酸化変異体を作製し、Rb タンパク質を基質とした *in vitro* キナーゼアッセイによりプロテインキナーゼ活性に及ぼす影響を調べた。

(2) PCTK3 の基質タンパク質の同定および生理機能の解明

COS-7 細胞に GST-PCTK3 と FLAG-cyclin A を遺伝子導入し、プルダウン後、Rb タンパク質以外に、CDK の他の一般的な基質である myelin basic protein と histone H1 を基質として、*in vitro* キナーゼアッセイを行った。

プロテインマイクロアレイを用いて、

PCTK3 の基質タンパク質の探索を行った。PCTK3 酵素として、COS-7 細胞で発現させた Strep -PCTK3 S12D を Strep-Tactin でアフィニティー精製したもの(純度: SDS-PAGE、CBB 染色後、ほぼ単一バンド)を用いた。同定された候補基質に関して、cDNA クローニングを行い、*in vitro* キナーゼアッセイにより PCTK3 によるリン酸化の確認を行った。

PCTK3 特異的 siRNA を HEK293T 細胞に遺伝子導入した。各種抗リン酸化抗体を用いて、PCTK3 ノックダウンによる各種シグナル伝達への影響を解析した。

4. 研究成果

(1) PCTK3 の活性調節機構の解明

Strep-PCTK3 に依存して 90、70、66、60、30 kDa のタンパク質バンドが検出された。質量分析によって、分子量の高いものから heat shock protein 90、heat shock 70kDa protein、T-complex protein 1 subunit gamma、T-complex protein 1 subunit epsilon(T-complex protein 1: chaperonin family)がそれぞれ同定されたが、30 kDa 付近に検出されたタンパク質は同定できなかった。

特異的抗体が利用できなかった cyclin F、K、O、Y に関して、cDNA クローニングを行い、プルダウンアッセイに用いた。PCTK3 との相互作用をそれぞれ調べたが、いずれも結合は認められなかった。また、PCTK3 は 14-3-3 と結合することを見出したが、14-3-3 による cyclin A-PCTK3 相互作用および PCTK3 活性への影響は認められなかった。この相互作用がどのような意義を持つのかは今後の検討課題である。

リン酸化モチーフ検索により、PCTK3 には cAMP-dependent protein kinase A (PKA) による推定リン酸化部位 (RRXS/T) が 4 ヶ所存在することが判明した。そこで、PCTK3 が PKA によってリン酸化されるか否か検討した。アデニル酸シクラーゼ活性化剤である forskolin により刺激した HEK293T 細胞を、抗 PCTK3 抗体を用いて免疫沈降した後、抗リン酸化 RRXS/T 抗体を用いてイムノプロット解析を行った。その結果、forskolin 処理により PCTK3 の特異的なリン酸化が検出された。また、*in vitro* キナーゼアッセイにより、PCTK3 が PKA によって直接リン酸化されること、加えて、非リン酸化変異体を用いることによって、4 ヶ所の推定リン酸化部位の中で 3 ヶ所 (Ser¹²、Ser⁶⁶、Ser¹⁰⁹) が PKA によってリン酸化されることを明らかにした。さらに、これら 3 ヶ所を Asp に置換した擬似リン酸化変異体をそれぞれ作製し、それぞれのリン酸化活性を調べた。S66D と S109D 変異体の Rb リン酸化活性には影響は見られなかったが、S12D 変異体は cyclin A 非存在下においても

Rb をリン酸化し、cyclin A 存在下においては、cyclin A/CDK2 に匹敵するほどの高い活性を有することが明らかとなった。

(2) PCTK3 の基質タンパク質の同定および生理機能の解明

CDK の一般的な基質として用いられる Rb タンパク質、myelin basic protein、histone H1 の 3 種類の中では、Rb タンパク質が最も効率的に cyclin A/PCTK3 によってリン酸化されたが、そのリン酸化は cyclin A2/CDK2 によるリン酸化と比較して非常に弱かった。また、Rb のリン酸化の検出に 2 種類の抗リン酸化 Rb (Ser⁷⁹⁵、Ser^{807/811})抗体を用いたところ、いずれによっても cyclin A/PCTK3 による Rb のリン酸化が検出できたことから、*in vitro* では、PCTK3 は少なくとも Ser⁷⁹⁵、Ser^{807/811} の 2 箇所をリン酸化することが考えられた。

プロテインマイクロアレイにより、いくつかの基質候補を見出した。*in vitro* キナーゼアッセイにより、PCTK3 によりリン酸化されるか確認を行ったが、全て偽陽性であり、基質同定には至らなかった。

内在性 PCTK3 の発現が認められる HEK293T 細胞に PCTK3 siRNA を導入し、形態観察を行ったところ、PCTK3 ノックダウンにより細胞の形態が変化し、コントロール細胞と比較して細胞の進展が認められた。また、細胞遊走への影響を調べたところ、PCTK3 ノックダウン細胞において細胞遊走が促進されることが明らかとなった。さらに、phalloidin 蛍光染色を行った結果、PCTK3 ノックダウン細胞において、細胞膜辺縁に F-actin の凝集が観察された。

アクチンフィラメント動態は、アクチン脱重合因子であるコフィリンによって調節されており、コフィリンは Ser³ がリン酸化されることで不活性化される。そこで、PCTK3 ノックダウン細胞および過剰発現細胞におけるコフィリンのリン酸化状態について調べた。その結果、PCTK3 ノックダウン細胞では、コフィリンのリン酸化が増加したのに対して、野生型 PCTK3 を過剰発現させることによってコフィリンのリン酸化は減少した。さらに、擬似リン酸化変異体である PCTK3 S12D を過剰発現させた細胞では、野生型 PCTK3 に比較してコフィリンのリン酸化はより抑制されることが明らかとなった。

続いて、PCTK3 ノックダウン細胞を ROCK 特異的阻害剤である Y27632 で処理し、コフィリンに及ぼす影響を調べた。その結果、ノックダウンによるコフィリンのリン酸化亢進が抑制されたことから、PCTK3 は RhoA/ROCK シグナル伝達経路の調節を介して細胞運動制御に関わる可能性が考えられた。そこで、RhoA 及び Rac1 の活性を調べた結果、

PCTK3 ノックダウンによって RhoA 活性が増加したのに対して、Rac1 活性は減少したことから、PCTK3 は RhoA/Rac1 活性のバランス制御を介して ROCK 活性、それに続く細胞骨格制御や細胞運動に関与することが考えられた。

さらに、PCTK3 が RhoA/ROCK の上流因子に及ぼす影響を調べた結果、PCTK3 ノックダウンにより細胞接着斑の構成因子である focal adhesion kinase 1(FAK1)および Src の活性が上昇することを見出した。加えて、接着斑の形成に関わるタンパク質群について、PCTK3 との相互作用を調べた結果、FAK1 および α -actinin と結合することが明らかとなった。PCTK3 が発現していない HeLa 細胞において、FAK1 は接着斑に局在するが、PCTK3 の過剰発現によって FAK1 の接着斑への局在が抑制され、PCTK3 と細胞質で共局在した。また、fibronectin でコーティングしたディッシュに細胞を播種すると、FAK1 の活性化に関わる Tyr³⁹⁷ のリン酸化の亢進が認められたが、恒常活性型 PCTK3 の過剰発現によって、そのリン酸化は有意に抑制された。これらのことから、PCTK3 は FAK1 の活性を負に制御し、細胞運動を調節していることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Shinya Matsuda, Kyohei Kominato, Shizuyo Koide-Yoshida, Kenji Miyamoto, Kinuka Isshiki, Akihiko Tsuji and Keizo Yuasa: PCTAIRE kinase 3/cyclin dependent kinase 18 is activated through association with cyclin A and/or phosphorylation by protein kinase A. *J. Biol. Chem.* **289**, 18387-18400 (2014) 査読有

doi: 10.1074/jbc.M113.542936

〔学会発表〕(計 9 件)

松田真弥, 宮本賢治, 辻明彦, 湯浅恵造: PCTK3/CDK18 は FAK1 を抑制して細胞形態を制御する, 日本農芸化学会 2016 年度大会, 2016 年 3 月 27-30 日, 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

松田真弥, 湯浅恵造: CDK ファミリーメンバー PCTK3/CDK18 は cyclin A 及び PKA によって活性調節を受け、アクチン動態を制御する, 第 15 回日本蛋白質科学会年会 ワークショップ, 2015 年 6 月 24-26 日, あわぎんホール(徳島県徳島市)

Shinya Matsuda, Kyohei Kominato, Akihiko Tsuji and Keizo Yuasa: PCTAIRE kinase 3/cyclin dependent kinase 18 is activated through association with cyclin A and/or phosphorylation by protein kinase A, *Experimental Biology* 2015, March 28 to April 1, 2015, Boston Convention and Exhibition Center, (Boston, Massachusetts, USA)

松田真弥, 宮本賢治, 小松弘明, 辻明彦, 湯浅恵造: PCTK3 はアクチン動態を制御する, 日本農芸化学会 2014 年度中四国支部大会, 2014 年 9 月 26-27 日, 徳島大学(徳島県徳島市)

松田真弥, 小湊恭平, 小出静代, 宮本賢治, 辻明彦, 湯浅恵造: PCTK3 は cyclin A 及び PKA によって活性調節を受け、アクチン動態を制御する, 日本農芸化学会 2014 年度大会, 2014 年 3 月 27-30 日, 明治大学(神奈川県川崎市)

松田真弥, 小湊恭平, 小出(吉田)静代, 宮本賢治, 辻明彦, 湯浅恵造: サイクリン依存性キナーゼ 18/PCTAIRE キナーゼ 3 はサイクリン A2 及び PKA によって活性化される, 第 36 回日本分子生物学会年会, 2013 年 12 月 3-6 日, 神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)

小湊恭平, 松田真弥, 辻明彦, 湯浅恵造: cyclin A および PKA による CDK ファミリー PCTK3 の活性化機構, 第 86 回日本生化学会大会, 2013 年 9 月 11-13 日, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

松田真弥, 小湊恭平, 宮本賢治, 辻明彦, 湯浅恵造: CDK ファミリー PCTK3 は cyclin A および PKA によって活性化する, 日本農芸化学会関西・中四国・西日本支部および日本ビタミン学会近畿・中国四国・九州沖縄地区合同大会 2013 年度合同広島大会, 2013 年 9 月 5, 6 日, 県立広島大学(広島県広島市)

小湊恭平, 松田真弥, 辻明彦, 湯浅恵造: CDK ファミリー PCTK3 の活性化機構の解明, 第 54 回日本生化学会中国・四国支部例会, 2013 年 5 月 31 日-6 月 1 日, 徳島大学(徳島県徳島市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

湯浅 恵造 (YUASA KEIZO)

徳島大学・大学院ソシオテクノサイエンス研究部・准教授

研究者番号: 70363132

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者